

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

03.03.00

JP00/1267

3U

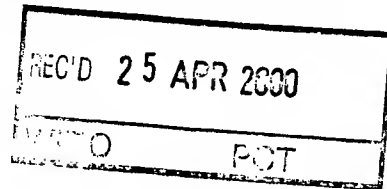
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月 3日



出願番号

Application Number:

平成11年特許願第249845号

出願人

Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所  
中外製薬株式会社

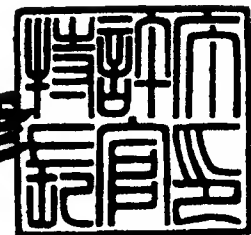
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3023370

【書類名】 特許願

【整理番号】 991411

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成11年 9月 3日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区神陵台4-1-51-507

    【氏名】 真弓 忠範

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府八尾市西木の本4-4-1 木の本合同宿舎3-  
101

    【氏名】 中川 晋作

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市栗生間谷西4-2-20-503

    【氏名】 堤 康央

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府吹田市山田6-8-301

    【氏名】 中西 真人

【特許出願人】

    【識別番号】 596102791

    【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【特許出願人】

    【識別番号】 000003311

    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089705

    【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705604

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞内薬物徐放化方法及び製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理活性物質を封入したナノスフェアーを、膜融合能を有するリボソームで封入することを特徴とする、細胞質内への生理活性物質導入用徐放性組成物。

【請求項2】 ナノスフェアーの粒径が10～600nmである請求項1記載の組成物。

【請求項3】 膜融合能がセンダイウィルスに由来するものであることを特徴とする請求項1又は2記載の組成物。

【請求項4】 生理活性物質が、低分子量の薬物、蛋白質及び遺伝子からなる群から選択される請求項1、2又は3記載の組成物。

【請求項5】 生理活性物質をナノスフェアーに封入し、さらにそのナノスフェアーを膜融合能を有するリボソームに封入することからなる、生理活性物質含有、細胞質内徐放化組成物の製造方法。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかの組成物を生存している細胞に接触させることを特徴とする、動物に生理活性物質を導入する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、薬物、蛋白、遺伝子等の生理活性物質を細胞内に直接導入し、細胞内で徐放するための技術に関する。さらに詳細には、目的の生理活性物質を細胞内に直接導入し、細胞内で徐放するための生理活性物質含有組成物及び方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、遺伝子治療や新規ワクチン療法などを行うために、遺伝子や抗原蛋白質などの生体高分子物質を細胞質内に直接、効率良く導入する開発が進めれている。特に、遺伝子、抗原蛋白質、生理活性蛋白質等の高分子物質は、低分子の薬物

と異なり、膜透過性が悪く、吸収や組織移行性に乏しい上、血中で速やかに分解されてしまう。このような高分子生理活性物質を細胞に傷害を与えることなく自由に効率良く細胞質内に導入する技術の開発が望まれていた。

#### 【0003】

リボソームは多くの物質を保持することができ、しかも生体適合性であるため、生物活性物質運搬のためのキャリアーとして従来から注目されている。しかしながら、リボソームでは、細胞内への目的物質の導入効率が非常に悪く、ほとんど細胞質内へ導入されない。そのため、リボソーム表面をレクチン、抗体等で修飾して積極的に細胞表面に結合させる方法等、種々の工夫がなされてきた。しかしながら、リボソーム及び表面修飾リボソームは、いずれもエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれるため、ライソソーム酵素によって分解されてしまい、目的導入物質が実際に細胞質内に移行する割合が著しく低レベルになってしまうという欠点があった。

#### 【0004】

このような欠点を克服するため、エンドサイトーシス経路によらず、細胞の細胞膜を通過して細胞質に直接導入できるキャリアーとして、リボソームにセンダイウィルスの膜融合能を付与した膜融合リボソームが開発されたことが報告されている。この膜融合リボソームは、細胞膜への融合を仲介するセンダイウィルス外被蛋白質とリボソームとの複合体を形成させることによって作製される。この膜融合リボソームは、センダイウィルスとほぼ同等の膜融合活性を有し、遺伝子、蛋白質等の高分子物質を内封することにより、細胞に傷害を与えることなく、効率良く目的物質を細胞質中に直接導入できると報告されている（日本DDS学会誌「DDS」、Vol. 13, No. 1（1998年1月）第21～26頁、同誌第27～33頁）。

#### 【0005】

このような膜融合リボソームをキャリアーとする方法においても、細胞内での生理活性物質の放出を制御できないため、導入された物質が一時に放出され、その活性（毒性）が持続しないという欠点があった。例えば、細胞質内に遺伝子を

導入する場合、細胞質内での遺伝子の分解により発現が持続しない。また、薬理活性を有する蛋白質の場合、その活性が持続せず、投与回数及び投与量を増加させることが必要になる。したがって、生理活性物質を細胞内に直接に効率良く導入し、しかも細胞質内でこれらの物質の放出を制御することにより、細胞内での生理活性を効率的に発揮することが可能になる。このような細胞内導入用でかつ、細胞内で目的導入物質を徐放化できる運搬キャリアーの開発が望まれている。

【0006】

### 【発明が解決しようとする課題】

生理活性物質、特に蛋白質や遺伝子のような高分子物質を効率良く、しかも細胞膜を損傷することなく細胞内に導入でき、しかも細胞内において目的物質の放出プロフィルを制御、調節できる、安全かつ安定な運搬キャリアーを開発が望まれている。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、薬物の徐放化技術の一環として開発されている、ナノスフェア（nanosphere）に着目し、このナノスフェアと膜融合リポソームとを組み合わせることを見出して本発明を完成した。

【0008】

従来より、生体内における薬物の徐放化を目指した研究が盛んに行われており、多くの技術が提案されている。その1つとして、ナノスフェアの技術がある。ナノスフェアは高分子マトリックス等からなり、その内部に多量の薬物又は高分子量の物質を封入できる微粒子である。ナノスフェア中に封入された薬物の放出速度は、そのナノスフェア微粒子の大きさ、マトリックス構成高分子の種類、及び高分子の分子内または分子間の架橋度等を適宜選択することにより制御可能である。しかしながら、ナノスフェアは、単独では細胞内に取り込まれにくく、取り込まれたとしてもエンドサイトーシス経路によるため、ライソゾーム酵素による分解を受けるため、導入効率が極端に悪くなるという欠点がある。

【 0 0 0 9 】

本発明者等は、目的生理活性物質封入ナノスフェアを膜融合リポソームと組み合わせて用いることが出来れば、細胞質内へのナノスフェアが効率良く導入でき、しかもナノスフェア内に封入された目的物質の細胞質内での放出が制御できるのではないかと考え、研究を重ねて本発明を完成した。

#### 【0010】

本発明は、薬物、蛋白質、遺伝子等の生理活性物質を封入したナノスフェアを、センダイウィルスの膜融合能を付与したリポソームに封入することを特徴としており、細胞内へ生理活性物質を直接かつ効率良く導入し、しかも細胞質内で徐放するための方法及びそのための組成物を提供するものである。

#### 【0011】

本発明で利用できるナノスフェアは、本発明の目的に沿ったものであれば、従来知られた如何なる材料及び方法を用いて作成されたものでも良い。例えば、Leelarasamee N. et al, J. Microencapsul. 5; 147-57, 1988、Singh M. et al, Pharm. Res. 12; 1796-1800, 1995、Rutledge L.C. et al, J. Am. Mosq. Dontrol. Assoc. 12; 39-44, 1996、Li J. K. et al, J. Pharm. Sci. 86; 891-895, 1997、Kofler N. et al, Int. Arch. Allergy. Immunol. 113; 424-432, 1997等を参照されたい。本発明に利用できるナノスフェアは10nm～1000nm、好ましくは20～600nmの粒径を有するものである。

#### 【0012】

本発明によれば、目的の生理活性物質を公知の方法でナノスフェア内に封入し、このナノスフェアを更に膜融合リポソーム中に封入した細胞内導入用、細胞質内徐放性組成物を作成する。リポソームはナノスフェアを保持できるものであれば特に限定されることなく用いられ、常法により、例えば逆相蒸発法 (Szoka, F., et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol601 559(1980))、エーテル注入法 (Deamer, D.W., Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 308 250(1978)、界面活性剤法 (Brunner, J., et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol.455 322(1976))等が用いられる。

#### 【0013】

リポソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類

、チッソ脂質等の慣用の脂質を用いることができ、一般的にはリン脂質が好適である。リン脂質としては、各種天然リン脂質及びこれらの水素添加物、及び合成リン脂質が挙げられる。これらを単独又は2種以上の混合物として使用することもできる。さらに、一般に、リポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール、ステアリルアミン、アルファートコフェロール等を、リポソーム形成時に添加することもできる。

#### 【0014】

リポソームは、その構造が巨大な一枚膜リポソーム (GUV)、大きな一枚膜リポソーム (LUV)、多重層リポソーム (MLV)、小さな一枚膜リポソーム (SUV) のいずれであっても良い。その大きさも、GUVでは、1000 nm 以上、LUVでは100 nm~1000 nm、MLVでは200~5000 nm、SUVでは100 nm以下の粒径である。本発明の目的には、10 nm~10  $\mu$ m程度、更に好ましくは10~1000 nmの粒径が好ましい。

#### 【0015】

適当な脂質又は混合脂質等のリポソーム形成物質とリポソーム形成用添加剤としてのコレステロール等と共に、テトラヒドロフラン、クロロホルム、エタノール等のような有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて、減圧下に溶媒を留去して容器内面にリポソーム形成物質の膜を得る。例えば、ロータリーエバポレーターを用いて遠沈管内壁に脂質のフィルムを作製する。これにナノスフェア溶液を内水相として添加し、混合する。さらにこのリポソーム溶液をセンダイウィルス、不活性化センダイウィルス、センダイウィルスより精製された膜融合促進蛋白質等の膜融合促進物質と反応させ、膜融合リポソームを作製する。センダイウィルスは元々ヒトに対して病原性を持たないが、更にUV照射することにより、ウィルスRNAを断片化することによって安全性を高めることが好ましい。また、本発明の膜融合リポソームは、センダイウィルスの膜融合能のみをリポソームに付与するものであり、安全な粒子である。本発明の膜融合リポソームは、例えばバンハム等の方法 (Bangham A.D. J. Mol. Biol. 13; 238-252, 1965) により作成できる。

#### 【0016】



本発明の膜融合リポソームに封入できる生理活性物質とは、細胞内に導入されて生理作用を生じる各種薬物；ホルモン、リンホカイン、酵素などの生理活性蛋白質；ワクチンとして作用する抗原蛋白質；細胞内で発現する遺伝子、プラスミド等の遺伝子、又は発現を誘発又は誘導する特定の遺伝子の発現に関与する遺伝子；さらに遺伝子治療のために導入される各種遺伝子及びアンチセンス等を挙げることができる。本発明の技術は蛋白質、遺伝子などの高分子量生理活性物質に適用するのに適しているが、低分子量の各種薬物に適用して好ましい結果を得ることができる。

#### 【0017】

本発明の膜融合リポソームは、前述のように安全であるばかりでなく、安定性も高く取り扱いも容易である。また、本発明の方法によれば、細胞質内への物質導入のバリアーである細胞膜の機能傷害を引き起こすことなく、効率良く目的物質を細胞質内に導入できる。さらに、導入される活性物質は、ナノスフェアの特性、例えば、作製材料、粒子サイズ、架橋度等を適宜選択することにより、その細胞質内での放出プロファイルを制御でき、例えば徐放性にするという、本発明の目的を達成できる。さらに、本発明の膜融合リポソームを生存している細胞に接触させることにより、動物に生理活性物質を導入することができる。

#### 【0018】

##### 【実施例】

本発明を以下に示す参考例及び実施例によって更に詳細に説明する。

〔参考例〕 膜融合リポソームによるナノスフェアの細胞内への導入

##### 実験材料

L- $\alpha$ -ジミリスチル ホスファチジン酸 (PA)、卵黄ホスファチジルコリン (PC)、クロロホルムは日本油脂 (株) のものを用いた。コレステロール、蔗糖、P-フェニレンジアミン、カルシウムイオノホアは和光純薬のものを用いた。フルオスフェア、カルボキシ修飾 0.02  $\mu$ m 黄緑色フルオロエセントとフルオスフェア (カルボキシ修飾 0.02  $\mu$ m 赤色フルオロエセント) (ナノスフェア)、カルシウムグリーン-1 アセトキシメチル誘導体は M o l e c

ular Probes, Inc. のものを用いた。イーグルMEMはニッスイのものを用いた。

【0019】

### 実験方法

#### <リボソーム、膜融合リボソームの作製及び精製>

リボソームは、前掲のBanghamらの方法を一部変更して作製した。混合脂質(12.72mg) [PA:PC:Chol=1:4:5 (モル比)] をクロロホルムに懸濁し、ロータリーエバポレーターを用いて遠沈管内壁にリピッドフィルムを作製した。これに内水相としてナノスフェア/BBS (-) 液300 $\mu$ lを加えボルテックスミキサーにより、リボソームを作製した。このリボソーム溶液をセンダイウイルスと37℃にて2時間振盪させることにより反応させ、膜融合リボソームを作製した。膜融合リボソームの精製は、反応液を6%、20%、30%、40%、50%の蔗糖密度勾配の上に重層し、24000rpm、4℃、2時間(SW28.1, Beckman) 遠心操作により行なった。遠心後、20-30%、30-40%蔗糖溶液の界面に存在する膜融合リボソーム分画を回収しBSS (-) にて洗浄した[20000rpm、4℃、40分間(SW28.1, Beckman)]。なお、膜融合リボソームはセンダイウイルスのRNAを断片化するため紫外線照射(2000J/m<sup>2</sup>) した後、実験に使用した。

【0020】

#### <リボソーム、膜融合リボソームのR18による標識>

0.1mMのR18/エタノール溶液を蛍光量150000 (Ex:490nm, Em:515nm) にそろえたりボソーム又は膜融合リボソーム溶液に1/100量加え、1時間室温で反応させた。未反応のR18は、25000rpm、4℃、40分間(SW55, Beckman) の遠心により除去した。

【0021】

#### <培養細胞>

マウス繊維芽細胞Ltk<sup>-</sup>細胞は10%牛胎児血清(FCS)を含むイーグルMEM培地で培養した。

## 【0022】

### ＜培養細胞へのナノスフェアの導入＞

$4 \times 10^4$ 個のLtk<sup>-</sup>細胞を4穴チャンバースライドに播種した。1日後、PBS(-)で細胞を洗浄し、血清無添加イーグルMEM培地に懸濁したナノスフェア、リポソーム、膜融合リポソーム(蛍光強度100000, Ex: 490 nm, Em: 515 nm)を1分間作用させた。PBS(-)で洗浄後、退色防止剤である0.1%p-フェニレンジアミン/イーグルMEM培地を加えた。

## 【0023】

### ＜共焦点レーザー顕微鏡での観察＞

共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡はMRC-1024(BIO-RAD)を用いた。Kr/Ar laserにより励起し、ナノスフェア(黄緑色フルオロエセント)はEx: 488 nm, Em: 540 nm (540 DF)、R18はEx: 568 nm, Em: 585 nm (585 LP)で観察した。

## 【0024】

### ＜Ca<sup>2+</sup>インディケーターを用いた細胞内導入効率の測定＞

ナノスフェア(赤色フルオロエセント)に蛍光Ca<sup>2+</sup>インディケーターであるカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を20 mMになるように混合し、1時間室温で混合することによりナノスフェアに吸着させた。作用後、吸着していないカルシウムグリーン-1を透析(Spectra/Por Membranes MWCO: 12-14000)により除去した後、バッファー置換してリポソーム及び膜融合リポソームを作製した。1日前に6穴プレートに播種した $2 \times 10^5$ 個のLtk<sup>-</sup>細胞をPBS(-)で洗浄し、蛍光強度2700 (Ex: 488 nm, Em: 534 nm)でそろえたカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体単独、カルシウムグリーン-1吸着ナノスフェア、リポソーム、膜融合リポソームを1分間作用させた。作用後、PBS(-)で洗浄し、イーグルMEM培地で1時間培養後、トリプシンで細胞をはがし、蛍光強度を測定した(Ex: 488 nm, Em: 534 nm)。その後、カルシウムイオノホア/DMSO溶液を0.1 mg/mlになるように添加し、Ex: 488 nm, Em: 534 nmで測定した。

### 実験結果と考察

最初に蛍光ラベル化された直径20 nmのナノスフェアーを用いて、このナノスフェアーがリボソームや膜融合リボソームに封入され得るかどうかを共焦点レーザー顕微鏡を用いて倍率10000倍で検討した。その結果、凝集している像ではあるが、直径20 nmのナノスフェアーの蛍光は、透過像写真によりリボソームや膜融合リボソームの観察される位置にのみ認められた。このことからナノスフェアーはリボソーム内に封入可能であり、そのリボソームを用いてナノスフェアー封入膜融合リボソームをも作製できることが明らかとなった。また、リボソーム又は膜融合リボソームに数個のナノスフェアーが封入されていることが確認された。次に、作製したナノスフェアー封入膜融合リボソームおよびリボソームをR18で膜標識した後、それぞれの細胞内へのナノスフェアー導入能をLtk<sup>-</sup>細胞を用いて検討した。ナノスフェアー封入リボソームやナノスフェアーのみを単独で作用させた細胞ではほとんど蛍光が認められなかったのに対し、膜融合リボソームを作用させた細胞では細胞内に多量のナノスフェアーが導入されているのが観察された。また、膜融合リボソームの膜標識に用いたR18の赤色蛍光の分布はナノスフェアーとは異なり細胞内には認められず、細胞膜上にのみ観察された。また、膜融合リボソームを作用させたLtk<sup>-</sup>細胞を細胞の接着面から4 μmごとにずらした断層像を観察したところ、細胞の形に合わせて細胞膜の内側にナノスフェアーが確かに存在し、R18の蛍光が細胞膜上にあることが確認できた。

### 【0026】

膜融合リボソームの膜融合能が再確認されたと共に、懸濁状態であるナノスフェアーをも膜融合リボソームは効率良く細胞質内に導入できることが示唆されたので、次に、本現象をCa<sup>2+</sup>インディケーターであるカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を用いてさらに詳細に検討した。カルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体はそれ自身は蛍光を有しないが、細胞内で内因性のエステラーゼにより加水分解され、Ca<sup>2+</sup>とキレートを形成することで初めて強い蛍光を発する。そこで、この性質を利用し、まずカルシウムグリーン-1アセトキ

シメチル誘導体を表面に吸着させたナノスフェアを作製し、これを封入した膜融合リポソームを用いて細胞質内への導入を検討した。細胞質内にほとんどカルシウムが存在しない条件下ではどの群においても蛍光はほとんど認められなかった。また、カルシウムイオノホア作用により細胞内カルシウム濃度を上昇させても、ナノスフェア単独やナノスフェア封入リポソームを作用させた細胞では蛍光は認められなかった。さらに受動的に細胞質内に輸送されるカルシウムグリーン-1アセトキシシメチル誘導体自身を作用させた細胞ではわずかに蛍光が認められた程度であった。しかし、ナノスフェア封入膜融合リポソームを作用させた細胞ではカルシウムグリーン-1アセトキシシメチル誘導体自身を作用させた細胞の20倍以上もの強い蛍光が認められ、膜融合リポソームを用いることによりナノスフェアを効率よく積極的に細胞質内へ導入できることが判明した。

#### 【0027】

以上の結果より、膜融合リポソームを用いることにより直径20nmのナノスフェアは細胞質内へ直接導入され、その導入効率が非常に高いことが判明した。また、膜融合リポソームを用いることにより、分子だけでなく粒子までも細胞質内に導入できることが判明したことから、細胞内での物質の空間的動態制御はもちろんのこと、導入した粒子からの薬物徐放といった時間的動態制御をも達成出来る可能性が示された。

#### 【0028】

[実施例1] 膜融合リポソームによるローダミン-PE封入ポリウレア  
ナノスフェア及びFITC-デキストリン封入ポリ(乳酸)  
ナノスフェアの細胞質内導入

参考例において、膜融合リポソームを用いることにより粒子である直径20nmのナノスフェアも効率よく細胞質内への導入可能であることが判明した。そこで次に、薬物徐放化能を持つナノスフェアを作製し、細胞質内への導入及びナノスフェアの細胞内での安定性を検討した。将来の細胞質内における薬物徐放化可能なナノスフェアモデルとして、脂溶性薬物モデルとしてローダミン-PEを封入したポリウレアナノスフェア、水溶液薬物モデルとしてFITC-Dextranを封入したポリ(乳酸)ナノスフェア(PLAナノスフェア

) を作製した。

#### 【0029】

この2種類のナノスフェアーを封入した膜融合リボソームを作製し、細胞に作用させた後、ナノスフェアーが細胞内で安定に存在しているかを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 【0030】

##### 実験材料

ジアシル ホスファチジルエタノールアミン-N-リサミン ロードミン B スルフォニル (ロードミン-PE) はAvanti Polar Lipids, Inc. のものを用いた。ポリビニルアルコール (PVA)、ドリーレンジイソシアネート (TDI)、大豆油、ポリ(乳酸) (分子量5000; PLA)、スパン80、塩化メチレンは和光純薬のものを用いた。FITC-デキストラン (分子量150000) はシグマのものを用いた。その他の試薬は前節の「実験材料」に準ずるものを用いた。

#### 【0031】

##### 実験方法

＜ロードミン-PE封入ポリウレアナノスフェアー (Ph-ポリウレアナノスフェアー) の作製＞

Ph-ポリウレアナノスフェアーは界面重合法により作製した。すなわち、0.5% PVA/H<sub>2</sub>O 20 ml を20000 rpmでホモジナイズし、TDI 2.4 g、大豆油2.5 gとロードミン-PE 0.5 mg/500 mlの混合物を、ゆっくりと加え、3分間ホモジナイズすることで水中油 (O/W) 型エマルジョンを作製した。0.5% PVA/H<sub>2</sub>O 100 ml を10000 rpmでホモジナイズしておき、先程ホモジナイズしておいた混合物をゆっくり加え、さらに10分間ホモジナイズすることで水中水中油 ((O/W)/W) 型エマルジョンを作製した。さらに、ナノスフェアー表面を強化するため0.5% PVA/H<sub>2</sub>O 100 mlを加え20分間、その後7000 rpm、2時間ホモジナイズすることによりRh-ポリウレアナノスフェアーを作製した。ナノスフェアーの精製は10%、20%、30%、40%、50%ステップ蔗糖密度勾配上にポリウ

レアナノスフェアーを重層し、24000rpmで2時間(SW28. 1、Beckman)の遠心操作により行なった。30-40%の蔗糖溶液の境界面に存在するRh-ポリウレアナノスフェアー分画を回収し、実験に使用した。

#### 【0032】

＜FITC-デキストラン封入PLAナノスフェアー(FITC-PLAナノスフェアー)の作製＞

FITC-PLAナノスフェアーは界面沈殿法により作製した。すなわち、PLAの1gとSpan80の1mlをCH<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>30mlに加え10000rpmでホモジナイズし、FITC-デキストラン100mg/mlを5mlゆっくりと加え1分間ホモジナイズして油中水(W/O)型エマルジョンを作製し、0.5%PVA/H<sub>2</sub>O100mlにゆっくり加えさらに5分間ホモジナイズすることで水中油中水((W/O)/W)型エマルジョンを作製した。さらに7000rpm、1分間ホモジナイズすることによりFITC-PLAナノスフェアーを作製し、上記条件下でステップ蔗糖密度勾配遠心により精製した。0-10%と10-20%の蔗糖溶液の境界面に存在するFITC-PLAナノスフェアー分画を回収し、実験に使用した。

#### 【0033】

＜膜融合リボソームの作製及び精製＞

参考例の「実験方法」の「リボソームと膜融合リボソームの作製及び精製」を改変して作製した。すなわち、Rh-ポリウレアナノスフェアー封入膜融合リボソームの作製において、ナノスフェアーの蛍光強度を50000(Ex: 550nm, Em: 590nm)にしてBanghamらの方法によりリボソームを作製した。その後10%、20%、30%、40%、50%蔗糖密度勾配上にリボソーム溶液を重層し、24000rpmで2時間(SW28. 1、Beckman)遠心し、20-30%の蔗糖溶液の境界面に存在する分画を回収し、リボソームを精製した。これをセンダイウイルスと反応させ、その後反応物を20%、30%、35%、45%、50%蔗糖密度勾配上に重層し、24000rpmで2時間(SW28. 1、Beckman)遠心し、30-35%及び35-40%蔗糖溶液の境界面に存在する分画を回収することによりRh-ポリウレアナノ

スフェア封入膜融合リポソームを精製した。

#### 【0034】

また、FITC-PLAナノスフェア封入膜融合リポソームの作製において、ナノスフェアの蛍光強度を10000 (Ex: 490 nm, Em: 520 nm) にしてリポソームを作製し、これをセンダイウイルスと反応させた。その後10%、20%、30%、40%、50%蔗糖密度勾配上に反応物を重層し、24000 rpmで2時間 (SW28.1, Beckman) 遠心した。0-10%、10-20%の蔗糖溶液の境界面に存在する分画から回収したナノスフェアから作製した膜融合リポソームはそれぞれ10-20%、20-30%の蔗糖溶液の境界面に存在し、この分画を回収することによりFITC-PLAナノスフェア封入膜融合リポソームを作製した。

#### 【0035】

##### <培養細胞へのナノスフェアの導入>

$4 \times 10^4$ 個のLtk<sup>-</sup>細胞を4穴チャンバースライドに播種した。1日後、PBS (-) で細胞を洗浄し、血清無添加イーグルMEM培地に懸懸したRh-ポリウレアナノスフェアとRh-ポリウレアナノスフェア封入膜融合リポソーム (蛍光強度10000, Ex: 550 nm, Em: 590 nm)、FITC-PLAナノスフェアとFITC-PLAナノスフェア封入膜融合リポソーム (蛍光強度700, Ex: 490 nm, Em: 520 nm) を1時間作用させた。PBS (-) で洗浄後、イーグルMEM培地で培養した。1日後、退色防止剤である0.1% P-フェニレンジアミン/イーグルMEM培地で置換し、観察した。

#### 【0036】

##### <共焦点レーザー顕微鏡での観察>

参考例の「実験方法」の「共焦点レーザー顕微鏡での観察」に準じて行なった。ローダミン-PEはEx: 568 nm, Em: 585 nm (585 LP)、FITC-デキストランはEx: 488 nm, Em: 540 nm (540 DF) で観察した。

#### 【0037】



作製したRh-ポリウレアナノスフェアとFITC-PLAナノスフェア及びそれぞれのナノスフェア封入膜融合リポソームを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、それぞれのナノスフェアが確かに作製されたことが判明した。

#### 【0038】

また、透過像写真において膜融合リポソームが観察される位置にそれぞれのナノスフェアに封入された物質の蛍光が存在することから、ポリウレアナノスフェア、PLAナノスフェアは膜融合リポソームに封入可能であることが観察された。この実施例で作製したナノスフェアは透過像写真により、ポリウレアナノスフェアの場合、粒子径は200nm前後、PLAナノスフェアでは約500nmであることが判明した。また、それぞれのナノスフェアは膜融合リポソームに封入されており、膜融合リポソームのサイズに対し比較的大きな粒子であるナノスフェアでも膜融合リポソームに封入可能であることが判明した。さらに、ポリウレアナノスフェアが膜融合リポソームに封入できたことより、これまでのリポソーム作製法では封入効率が低かった疎水性の薬物をも大量に封入した膜融合リポソームを作製できることが判明した。また、これらのナノスフェア封入膜融合リポソームをLtk<sup>-</sup>細胞に作用させて1日後に観察したところ、これらのナノスフェアは細胞内に確かに存在することが観察された。また、膜融合リポソームによりナノスフェアを導入したLtk<sup>-</sup>細胞は1日後においても形態変化は観察されず、表面的な細胞傷害性はないことが判明した。

#### 【0039】

このことより、膜融合リポソームは100から500nmのナノスフェアでも細胞質内に導入可能であり、さらにこれらのナノスフェアは1日後においても細胞質内に安定に存在することが確認できた。そこで実施例2では、作製したナノスフェアからの薬物の放出について検討した。

#### 【0040】

【実施例2】FITC-デキストラン封入ポリ（乳酸）ナノスフェアの  
徐放化能

実施例1において、作製したナノスフェアが膜融合リポソームにより細胞質

内へ導入可能であり、かつ少なくとも24時間は細胞内で安定に存在することが判明したが、これらのナノスフェアが薬物放出かつ徐放が出来なければ当然のことながら細胞内における薬物徐放化は望めない。そこで、FITC-デキストランをモデル薬物と見立て、作製したFITC-PLAナノスフェアからの徐放を検討した。

【0041】

#### 実験材料

試薬は実施例1の「実験材料」に準ずるものを用いた。

#### 実験方法

＜FITC-デキストラン封入PLAナノスフェアからの薬物徐放の評価＞

FITC-PLAナノスフェアを蛍光強度100000 (Ex: 490nm, Em: 520nm) でBSS (-) に懸濁し、37℃条件下でインキュベートした。0、1、2、3、4日後、10000rpmで遠心してナノスフェアを除き、上清のFITC-デキストランの量をEx: 490nm, Em: 520nmで蛍光光度計を用いて測定した。

【0042】

#### 実験結果と考察

実施例1で用いたFITC-PLAナノスフェアからのFITC-デキストランの放出を検討したところ、図1に示したように、4日後においてもわずか6%程度の放出率であり、ゆっくりと徐放されていることが判明した。PLAナノスフェア又はマイクロスフェアの薬物放出は3週間から3カ月程度と言われており、3日後の放出率が10数%という報告もあるが、この実施例で作製したPLAナノスフェアはこれまでの報告に比べると放出がやや遅い。しかし、PLAナノスフェアからの薬物放出速度は、PLAの分子量や球体サイズを調節することにより制御が可能であることから、ナノスフェアの作製条件を適宜変更することにより細胞質内での薬物徐放特性を調節できる。

【0043】

実施例1の結果とこの実施例2の結果を考え合わせるにより、細胞質内においてナノスフェアからの薬物の徐放化が達成された。

### 【実施例3】ゼラチンナノスフェアに封入されたプラスミドDNAの

#### 安定化及び徐放化に関する検討

T7発現系はバクテリオファージのT7RNAポリメラーゼとT7プロモーター配列を有するプラスミドDNAとを同時に細胞質内に存在させることにより効率よい遺伝子発現が可能となるものである。しかしながら、細胞質内におけるプラスミドDNAの安定性が乏しいため、遺伝子が速やかに分解され消失してしまい、遺伝子発現期間が非常に短い。したがって、T7発現系により、疾病治療に必要な期間、必要な量の遺伝子発現を行わせるためには、細胞質におけるプラスミドDNAの安定化および徐放化といった細胞質内での遺伝子の動態制御が必要となってくる。その点、ナノスフェアは徐放化製剤として用いられており、さらに参考例、実施例1、2において細胞質内へ導入及び徐放化が可能であることが判明している。ナノスフェアの材質としては前章で述べたPLAなど様々なものがあるが、中でもゼラチンは、生体適合性に優れており、プラスミドDNAをはじめとした高分子とのコアセルベーションによりゼラチンナノスフェアを容易に形成可能である。また、遺伝子発現を指標として細胞内徐放を評価するにあたり、ゼラチンナノスフェアは、架橋により容易に放出パターンの制御が簡便である上、一般に放出速度が速いと認識されているPLAナノスフェアよりもさらに薬物放出速度が速いため実験上評価しやすいと考えられる。以上の点から、細胞内徐放をT7発現系に応用する最初の段階としてゼラチンナノスフェアは、非常に適していると考えられる。そこで、本実施例では、プラスミドDNAを含有したゼラチンナノスフェアを相分離法により作製し、プラスミドDNAの安定化作用やプラスミドDNAの放出制御に関する検討を行った。

【0044】

#### 実験材料

ゼラチン（タイプA：豚の皮から製造）はシグマ社から入手したものを用いた。2-モルホリノエタンスルホン酸の一水和物（MES）、1-エチル-3（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC、WSC）、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、グリシンは和光純薬のものを用いた。ペントバルビタールは大日本製薬のものを用いた。その他の試薬は前節までの「実験材料」に準ずるものを用いた。

【0045】

### 実験方法

＜pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチナノスフェアの作製＞

pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチナノスフェアを相分離法により作製した。5%ゼラチン溶液100mlと0.2mg pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA/ml 45mMNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を1.5ml エッペン中で混合し、57℃の水浴中で10分間インキュベートした。その後、1分間ボルテックスし、35%、55%、66%の蔗糖密度勾配の上層にのせ、19000rpm、20℃、1時間（SW55、Beckman）遠心し、pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチナノスフェアが含まれる55%蔗糖の層を分取し、実験に使用した。

【0046】

＜ゼラチナノスフェアの架橋処理＞

前述のゼラチナノスフェアの作製後、55%層を2倍に薄め、MESバッファー溶液（0.2M MES, EDC 0.1又は0.5mg/ml, pH4.5）を1/10量加え、反応させた。30分後、グリシンを0.2Mになるように加え、反応を停止させた。

【0047】

＜S-9分画の作製＞

ウィスター系ラットを1晩絶食させ、ペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔し、心臓採血により脱血死させた。氷冷0.15M KClを門脈より肝臓に還流して肝臓の血液を出来るだけ除いた。肝臓を摘出して氷冷0.15M KClで洗浄し、肝臓の重量の3倍量の氷冷0.15M KClを加え、氷冷下でホモジナイズした。9000g、4℃、10分間遠心し、上清をS-9分画として用いた。なお、S-9分画は液体窒素を用いて急速凍結した上で、-80℃で保存した。

【0048】

### <プラスミドDNAの安定化の検討>

pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを5% S-9分画溶液に入れ37℃で反応させた。一定時間後、遠心して得たナノスフェアはトリプシン処理して崩壊させ、エチジウムブロマイドでプラスミドDNAを標識し、アガロース電気泳動によりプラスミドDNAの安定性を評価した。

【0049】

### <ゼラチンナノスフェアからのプラスミドDNAの放出>

pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを上述の方法を用いてそれぞれの濃度で架橋処理し、1.25mg/mlトリプシン中で一定時間処理した。その後、遠心してナノスフェアを除去し、プラスミドDNAの放出量をDABAを用いて定量した。

【0050】

### 実験結果と考察

細胞内におけるプラスミドDNAの安定性を評価する目的で、モデルとしてラット肝ホモジネートのS-9分画を用い、プラスミドDNAの分解性をアガロースゲル電気泳動法により検討した(図2)。プラスミドDNAそのものをS-9分画と作用させた場合、30分以内にほとんど全てのプラスミドDNAが分解しているにもかかわらず、ゼラチンナノスフェアに封入したものでは60分以降においても安定にプラスミドDNAが存在していた。このことにより、ナノスフェアにプラスミドDNAを封入することによるプラスミドDNAの安定性の向上が示された。また、ゼラチンナノスフェアに種々の濃度にて架橋剤処理を行った後、トリプシン溶液中におけるゼラチンナノスフェアからのプラスミドDNAの放出パターンを検討したところ、架橋剤の処理濃度が高くなるにつれ放出量が抑制されることが示された(図3)。

【0051】

核内と比較し、プラスミドDNAが分解されやすい細胞質内において遺伝子発現を行なうT7発現系では、ナノスフェア内に含まれるプラスミドDNAの安定性とナノスフェアからの徐放速度が、遺伝子発現量と遺伝子発現期間の調節

に対し鍵を握ることになる。本結果はゼラチンナノスフェアに封入することによりプラスミドDNAの安定性が向上し、また、ナノスフェアの作製条件を変化させることにより、薬物（今回の実験においてはプラスミドDNA）の徐放化を自由にコントロール可能であることが示唆され、遺伝子発現量と遺伝子発現期間を調節できる可能性が示された。

#### 【0052】

##### 〔実施例4〕膜融合リボソームを用いたゼラチンナノスフェア封入プラスミドDNAの遺伝子発現

実施例3ではナノスフェアに封入することにより細胞内におけるプラスミドDNAの安定性の向上、およびゼラチンナノスフェアを架橋剤にて処理することによりプラスミドDNAの放出量を制御可能であることが示された。そこで実施例4では、実施例3の結果を踏まえ、T7発現系の遺伝子発現期間の延長および遺伝子発現量の増強を目指し、T7プロモーターを有するルシフェラーゼ発現プラスミドDNAであるpT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを膜融合リボソームを用いることによりT7RNAポリメラーゼ産生細胞に導入し、細胞内徐放に伴うT7発現系の遺伝子発現パターンへの影響について検討を行なった。

#### 【0053】

##### 実験材料

ルシフェラーゼ分析システム、ピッカジーンは東洋インキのものを用いた。その他の試薬は参考例及び実施例1～3までの「実験材料」に準ずるものを用いた。

#### 【0054】

##### 実験方法

##### <膜融合リボソームの作製と精製>

参考例の「リボソームと膜融合リボソームの作製と精製」を一部改変して作製した。すなわち、あらかじめ紫外線照射（ $2000\text{J}/\text{m}^2$ ）によりウイルスのRNA断片化させたセンダイウイルスとリボソームを反応させ、膜融合リボソームを得た。

【0055】

<培養細胞>

サル腎上皮細胞LLC-MK2#10細胞は10%牛胎児血清(fetal calf serum; FCS)を含むイーグルMEM培地で培養した。

【0056】

<培養細胞への物質導入>

$5 \times 10^4$  個のLLC-MK2#10細胞を12穴プレートに播種した。1日後、PBS(-)で洗浄後、適当な濃度に血清無添加イーグルMEM培地で希釈して遺伝子量を一定にそろえたpT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入膜融合リポソーム、pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチナノスフェア-封入膜融合リポソーム、pT7- $\beta$ -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチナノスフェアを1時間作用させた。PBS(-)で洗浄後、イーグルMEM培地で培養した。

【0057】

<ルシフェラーゼ活性の測定>

ルシフェラーゼ活性はルシフェラーゼ分析システム及びルミノメーター(Lumit LB 9507, Berthold)を用いて測定した。活性は比光ユニット(RLU)/ウェルとして表した。

【0058】

そのほかの実験方法については実施例3の「実験方法」に準じて行なった。

実験結果及び考察

0.01mg/mlのEDCにて架橋を行なったプラスミドDNA含有ナノスフェアを膜融合リポソームに封入し、T7RNAポリメラーゼ産生細胞に導入後、経日的な遺伝子発現を指標としてナノスフェアの有効性を検討した(図4)。遺伝子量をそろえたプラスミドDNAのみを封入した膜融合リポソーム及びプラスミドDNA封入ナノスフェアを同様に細胞に作用させ、経日的なルシフェラーゼ活性を測定した結果、ほとんどルシフェラーゼ活性が得られなかった。一方、プラスミドDNA封入ナノスフェアを封入した膜融合リポソームを用いた群では、遺伝子導入1日後および2日後において非常に高いルシフェラーゼ活

性が認められた。また、その遺伝子発現効率は、遺伝子導入後1日目と2日目においてほぼ同程度であった。従来、T7発現系における遺伝子発現パターンが遺伝子導入1日後から顕著に遺伝子発現が消失することが判明していることから、ナノスフェアに遺伝子を含有させ細胞質内に導入することにより、若干の遺伝子発現期間延長が認められたと考えられる。今回の条件下では4日目には遺伝子発現が減少してしまったが、遺伝子発現効率の上昇と少なくとも2日間の遺伝子の安定化作用は得られた。なお、ナノスフェアの作製条件を変化させることにより遺伝子発現量と遺伝子発現期間を調節可能となることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例2で作製したFITC-デキストランを封入したポリ（乳酸）ナノスフェアのFITC-デキストランの経時的放出を示すグラフである。

【図2】 実施例3で作製したT7プロモーター配列を有するプラスミドDNAを封入したゼラチンナノスフェアの、ラット肝ホモジェナイザー分画との反応におけるプラスミドDNAの安定性を示すアガロースゲル電気泳動図である。

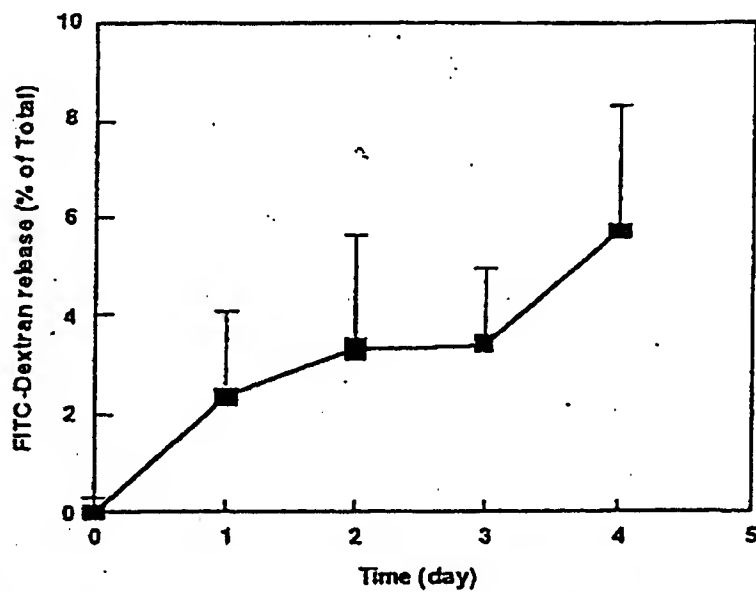
【図3】 実施例3のゼラチンナノスフェアにおける、ゼラチンの架橋度と封入プラスミドDNAの放出量との関係を示すグラフである。

【図4】 T4プロモーターを有するプラスミドDNAを封入したゼラチンナノスフェアを、更に封入した本発明の膜融合リボソームの、細胞内における同プラスミドDNAの経時的発現を示すグラフである。

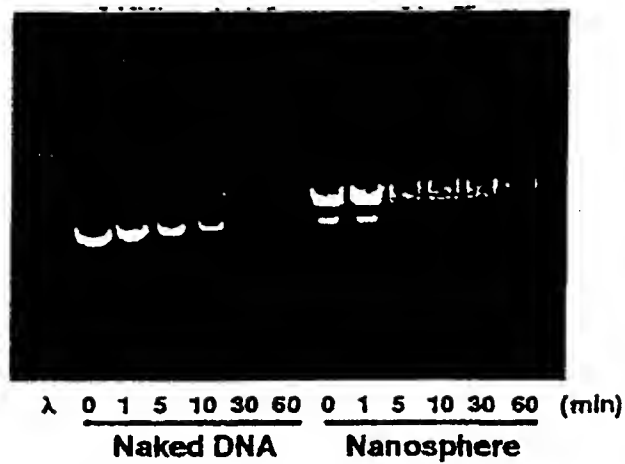


【書類名】 図面

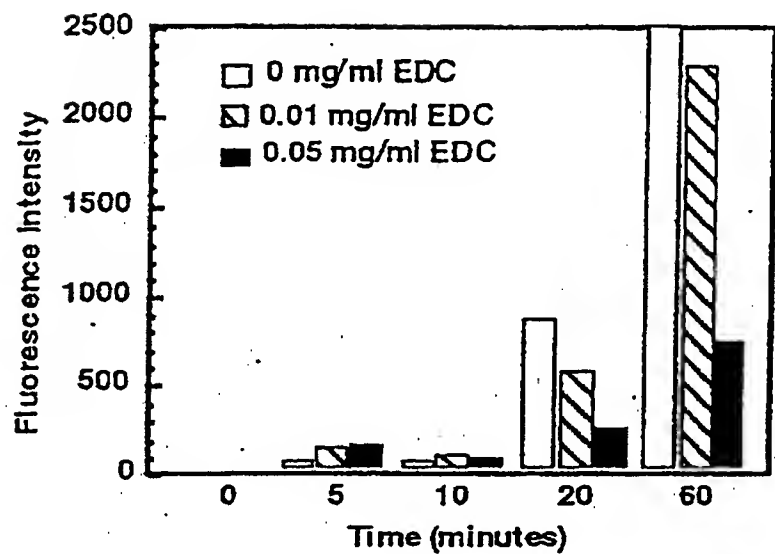
【図1】



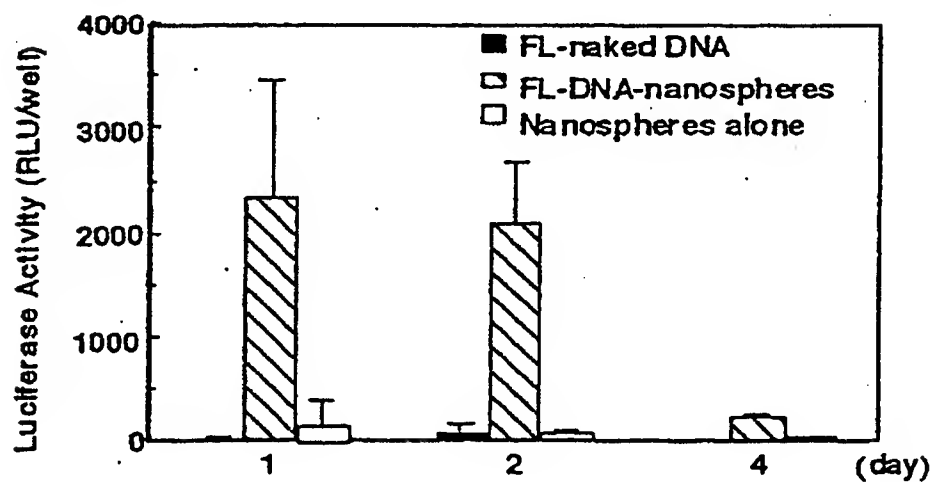
【図2】



【图 3】



【图 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生理活性物質、特に蛋白質、遺伝子のような高分子の生理活性物質を効率良く細胞内へ導入でき、しかも細胞内に導入された後、細胞内での当該活性物質の放出速度を制御できるような運搬キャリアーの開発が望まれている。

【解決手段】 目的導入物質をナノスフェア内に含有させ、このナノスフェアを膜融合リポソームに封入することにより、課題を解決した。なお、膜融合リポソームは、公知のリポソームにセンダイウィルスの膜融合能を付与することによって作製されるものである。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[596102791]

1. 変更年月日

1996年 7月15日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名

株式会社中外分子医学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名 中外製薬株式会社

